



# 携带与未携带松材线虫的松墨天牛转录组 差异表达基因分析

李鸣宇<sup>1,2</sup>, 周 娇<sup>2</sup>, 王海香<sup>1,\*</sup>, 赵莉茵<sup>2,\*</sup>

(1. 山西农业大学林学院, 山西太谷 030801;

2. 中国科学院动物研究所, 农业虫害鼠害综合治理研究国家重点实验室, 北京 100101)

**摘要:**【目的】本研究旨在建立携带与未携带松材线虫 *Bursaphelenchus xylophilus* 的松墨天牛 *Monochamus alternatus* 成虫各组织的转录组数据库,揭示松墨天牛对松材线虫响应的转录组整体表达特征。【方法】以携带和未携带松材线虫的松墨天牛成虫的表皮、气管和脂肪体为材料,采用 Illumina HiSeq™ 2000 测序平台开展转录组测序,利用 Trinity 软件对 RNA-Seq 数据进行从头组装,利用 NCBI 数据库进行基因注释。通过 DEG-Seq 分析携带和未携带松材线虫的松墨天牛成虫中的差异表达基因,对上调表达基因进行 GO 和 KEGG 代谢途径富集分析,并通过实时荧光定量 PCR 技术对部分差异表达的基因包括 ENV, CDK1, HSP70-C, HSP70, HSP75, DUO, PABPN1 和 IGFP 基因的表达水平进行验证。【结果】测序过滤后共获得 55 059 条单基因簇 (unigene),平均长度为 1 536 bp。将 unigene 与数据库中的序列进行 BLASTX 比对,成功注释 24 354 条 unigenes,其中 4 022 条 unigene 在 GO 数据库中获得注释,6 098 条 unigene 在 KEGG 数据库中获得注释。经过 GO 与 KEGG 富集分析显示,松墨天牛成虫携带松材线虫后,差异表达基因主要为与其气管中压力调节、组织与 DNA 修复、激素响应方面相关的基因。实时荧光定量 PCR 分析结果显示 CDK1, HSP70, HSP75, DUO, PABPN1 和 IGFP 基因的表达量在携带松材线虫的松墨天牛气管中相比未携带松材线虫的松墨天牛气管中的显著上调。【结论】本研究初步阐明松墨天牛携带松材线虫后转录组的整体表达模式,为进一步研究松墨天牛的基因功能及对松材线虫的胁迫响应过程奠定了基础。

**关键词:** 松墨天牛; 松材线虫; 转录组; 基因注释; GO; KEGG

中图分类号: Q966 文献标识码: A 文章编号: 0454-6296(2020)02-0207-11

## Transcriptome analysis of differentially expressed genes in *Monochamus alternatus* (Coleoptera: Cerambycidae) carrying and without carrying pine wood nematode (*Bursaphelenchus xylophilus*)

LI Ming-Yu<sup>1,2</sup>, ZHOU Jiao<sup>2</sup>, WANG Hai-Xiang<sup>1,\*</sup>, ZHAO Li-Lin<sup>2,\*</sup> (1. College of Forestry, Shanxi Agricultural University, Taigu, Shanxi 080301, China; 2. State Key Laboratory of Integrated Management of Pest Insects and Rodents, Institute of Zoology, Chinese Academy of Sciences, Beijing 100101, China)

**Abstract:** 【Aim】The objective of this study is to establish the transcriptome database of adult tissues of the pine sawyer beetle, *Monochamus alternatus*, carrying and without carrying the pine wood nematode, *Bursaphelenchus xylophilus*, and to reveal the overall expression characteristics of *M. alternatus* in response to pine wood nematode. 【Methods】The transcriptomes of epidermis, trachea and fat body of *M. alternatus* adults carrying and without carrying *B. xylophilus* were sequenced using the Illumina

基金项目: 中国科学院前沿科学重点研究项目 (QYZDB-SSW-SMC014); 国家自然科学基金项目 (31572272)

作者简介: 李鸣宇, 男, 1993 年 2 月生, 河北沧州人, 硕士研究生, 研究方向为林业有害生物综合治理, E-mail: 0713lmy@gmail.com

\* 通讯作者 Corresponding authors, E-mail: whx25@126.com; zhaoll@ioz.ac.cn

收稿日期 Received: 2019-09-02; 接受日期 Accepted: 2019-10-16

HiSeq™ 2000 platform, the transcriptome data were *de novo* assembled using Trinity software, and gene annotation was conducted by using the NCBI database. The differentially expressed genes in *M. alternatus* adults carrying and without carrying *B. xylophilus* were screened by DEG-Seq, and the up-regulated genes were subjected to GO and KEGG metabolic pathway enrichment analysis. The expression levels of some differentially expressed genes including ENV, CDK1, HSP70-C, HSP70, HSP75, DUO, PABPN1 and IGFP genes were verified by real-time quantitative PCR (RT-qPCR). 【Results】 After sequencing and filtering, a total of 55 059 unigenes were obtained with an average length of 1 536 bp. A total of 24 354 unigenes were annotated using BLASTX searches against the databases, of which 4 022 unigenes were assigned in GO database and 6 098 unigenes were assigned in the KEGG database. The enrichment analysis of GO and KEGG showed that the main differentially expressed genes in the trachea of *M. alternatus* adults carrying *B. xylophilus* are related with pressure regulation, tissue and DNA repair, and hormone response. The RT-qPCR analysis showed that the expression levels of CDK1, HSP70, HSP75, DUO, PABPN1, and IGFP genes were significantly higher in the trachea of *M. alternatus* carrying pine wood nematodes than in the trachea of *M. alternatus* without carrying pine wood nematodes. 【Conclusion】 This study preliminarily clarified the overall expression pattern of the transcriptome of *M. alternatus* carrying *B. xylophilus*, providing a foundation for further study of the gene function of *M. alternatus* and the stress response of *M. alternatus* to *B. xylophilus*.

**Key words:** *Monochamus alternatus*; *Bursaphelenchus xylophilus*; transcriptome; gene annotation; GO; KEGG

松材线虫 *Bursaphelenchus xylophilus* 属于侧尾腺纲 (Secernentea) 滑刃目 (Aphelenchida) 滑刃科 (Aphelenchoididae) 伞滑刃属 *Bursaphelenchus* (Nickle *et al.*, 1981), 是一种林业重大外来入侵害虫, 造成的松材线虫病, 即松树的“癌症”, 具有传染快致死快, 防治困难, 一经感染便无法治愈等特点 (Mamiya, 1972, 1983; 宁眺等, 2005)。松材线虫原产于北美洲, 于 20 世纪初传入亚洲, 近些年来又扩散到了欧洲国家, 除北美洲原产地以外, 对许多国家的森林生态系统造成了严重的破坏。松材线虫于 1982 年首次在我国南京中山陵发现, 而后不断扩散, 快速蔓延至江苏、浙江、安徽、广州和山东等 53 个县市区, 累计死亡松树 3 500 万株, 近年来疫情逐步加剧, 向中国北部蔓延 (Yano *et al.*, 1913; 孙永春, 1982; Futai, 2008; Nakamura-Matori *et al.*, 2008; Shin, 2008; Karnkowski and Sahajdak, 2010)。目前, 松材线虫已成为我国第一大林业害虫, 也是我国最为严重的林业外来有害生物, 给病害发生区带来了严重的损失 (张星耀和骆有庆, 2003)。随着国际贸易的全球化及我国加入世贸组织, 松材线虫由其他疫区传入我国非疫区的可能性不断加大, 风险不断加剧, 而且由于国内各种基建项目的施行及国内经济贸易活动的活跃, 松材线虫由我国国内疫区传入非疫区的可能性也在逐渐加大。因此, 松材线虫在我国仍具有十分广泛的定殖及扩

散的可能 (谢丙炎等, 2009; 魏亚楠, 2015)。

在中国和日本, 松材线虫的感染周期与松墨天牛 *Monchamus alternatus* 的羽化过程同步, 并且没有松墨天牛的携带, 松材线虫便无法被传播。松材线虫与松墨天牛间存在特殊的共生生活史。松材线虫生活史包含繁殖和扩散两个周期, 繁殖周期主要扩大种群密度, 致死松树; 扩散周期则主要通过媒介昆虫转移至新奇主。当松木内松材线虫大量繁殖, 其对松树的危害加剧, 造成树势衰弱甚至枯死, 从而吸引松墨天牛前来产卵。秋末冬初, 此时树势已不利于繁殖型松材线虫生长, 繁殖型 2 龄幼虫向扩散型 3 龄幼虫 (L<sub>III</sub>) 转变。此时, 松墨天牛孵化、幼虫蜕皮; 翌年早春, 树体内松墨天牛进入蛹期, 松材线虫扩散型 3 龄幼虫 (L<sub>III</sub>) 向松墨天牛蛹室聚集, 松树蒸腾作用降低、针叶萎蔫黄化。松材线虫扩散型 3 龄幼虫 (L<sub>III</sub>) 向扩散型 4 龄幼虫 (L<sub>IV</sub>) 的转变与松墨天牛蛹的发育期相一致, 翌年春天, 待松墨天牛从死树中羽化, 可耐干旱及恶劣环境, 也适合通过媒介昆虫传播的松材线虫扩散型 4 龄幼虫 (L<sub>IV</sub>) 同步形成, 并通过松墨天牛气管转移至新的健康松树, 每头松墨天牛平均携带量约 18 000 条, 最多可达 289 000 条 (Mamiya, 1983)。

松材线虫与松墨天牛的生活史显示, 两者间特殊的共生关系构成了松材线虫病形成的生物学基础。松材线虫扩散型 4 龄幼虫 (L<sub>IV</sub>) 通过其关键媒

介松墨天牛的气管被携带传播,而松墨天牛与松材线虫转型扩散发育进程的一致性为松材线虫扩散表型增强的关键。松墨天牛在羽化过程中释放大量的  $C_{15} - C_{18}$  脂肪酸乙酯,启动松材线虫 Insulin 和 DAF-12 信号通路,改变发育途径,进而诱导扩散型 3 龄幼虫 ( $L_{III}$ ) 形成扩散型 4 龄幼虫 ( $L_{IV}$ ) (Zhao *et al.*, 2013)。由  $L_{III}$  分泌的蛔甙能够诱导松墨天牛中的蜕皮激素生成并上调蜕皮激素相关基因表达,进而促进松墨天牛蛹化。一旦天牛进入成虫阶段,天牛分泌蛔甙并吸引  $L_{IV}$ ,从而促进松材线虫进入松墨天牛气管并被转运至新松树上 (Zhao *et al.*, 2016)。

总之,深入研究松墨天牛与松材线虫“协同互动”关系,对解释松材线虫扩散型 4 龄幼虫 ( $L_{IV}$ ) 被松墨天牛携带机制具有重要意义,对控制松墨天牛携带松材线虫的传播具有积极的理论和实际意义。因此,我们利用高通量 Illumina HiSeq™ 2000 测序技术、通过组装、功能注释和分析,全面探讨松墨天牛携带松材线虫后各个组织的转录组信息,挖掘松墨天牛应对松材线虫的压力响应基因,从分子水平上提供松墨天牛携带松材线虫后维持稳态的基因信息,也为深入研究松墨天牛能够携带松材线虫的机制奠定基础。

## 1 材料与方法

### 1.1 供试昆虫

携带松材线虫的松墨天牛采集自浙江富阳 (30° 07' N, 119° 55' E) 死亡的松树上,对照组所用的未携带任何线虫的松墨天牛收集自实验室种群。实验室人工饲养条件:幼虫放在装有木屑饲料的 10 cm 的指型管中,每 7 d 换一次饲料;成虫置于塑料盒中,每 7 d 换一次新鲜松枝,以上培养过程均置于人工气候箱中,饲养温度为 20 ~ 25℃,相对湿度 60% ~ 70%,光周期 12L: 12D。所有天牛在实验前均解剖出气管并检测携带线虫情况及数量后,再收集组织用于文库构建。所选携带松材线虫的松墨天牛样本,体内携带松材线虫的数量为 1 000 ~ 3 000 头。

### 1.2 文库构建

收集未携带松材线虫的松墨天牛成虫表皮 (EP-CK)、气管 (Tr-CK)、脂肪体 (Fb-CK) 以及携带松材线虫的松墨天牛表皮 (EP-Bx)、脂肪体 (Fb-Bx) 和气管 (Tr-Bx),用 PBS 洗涤,随后使用 Trizol (Thermo Fisher Scientific) 从组织中分离总 RNA,并在使用前储存在 -80℃ 冰箱。共构建 6 个基因文库,每个文库构建使用 5 头天牛的组织合并为一个

样品。剩余的天牛尸体浸入 PBS 中统计线虫的数量。用 ND-1000 分光光度计 (NanoDrop Technologies, Wilmington, DE, 美国) 测定 RNA 样品浓度和纯度。用 Dynabeads mRNA 纯化试剂盒 (Ambion; Thermo Fisher Scientific, 美国) 纯化 mRNA。RNA-Seq 文库制备试剂盒 (Compatible with Illumina, San Diego, CA, 美国, Illumina Whole-Genome Gene Expression BeadChip) 用于转录组文库构建,使用寡核苷酸 (dT) 磁珠 (Thermo Fisher Scientific, 美国) 富集含 Poly A 的 mRNA,然后对其进行片段化,反转录合成 cDNA。使用 MiniElute 凝胶提取纯化试剂盒 320 - 420 bp 产物 (Qiagen, Hilden, 德国),测序是在中国科学院基因组研究所的 Illumina HiSeq 2000 测序平台上完成。

### 1.3 转录组拼接及注释

在组装之前,去除低质量的原始 reads,过滤去除微生物 (细菌/病毒/真菌) 和线虫污染,获得的 clean reads 用于后续拼接。短 reads 在 Trinity (v. 2013) 中进行 *De novo* 组装 (Grabherr *et al.*, 2011)。组装的序列进一步通过 CD-HIT 软件 (Li and Godzik, 2006) 进行聚类,以精简冗余序列并人工校对。为了使转录本尽可能全面并避免增加组装的复杂性,将 6 个库合并组装,使用 Burrows-Wheeler Aligner (BWA) 软件 (Li and Durbin, 2009) 将测序读数重新整合到 unigenes 上,评估组装序列的准确性。

使用 BlastX 软件,将拼接转录本与 NCBI (<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/>) 非冗余蛋白数据库 (NR) 和 Swiss-Prot 数据库做比对,设置 E-value <  $10^{-5}$  为阈值,以第一匹配序列的信息作为注释结果。使用 Trinity 软件中的 RSEM 评估基因丰度水平,同时使用具有  $P < 0.001$  的 DEG-Seq 软件鉴定差异表达的基因 (DEG),并使用以下规则标记。将  $FDR$  (false discovery rate) 作为筛选的关键指标,将  $|\log_2 \text{Ratio}| \geq 2$  且  $Q\text{-value} \leq 0.05$  的基因作为差异表达基因,计算出上调与下调的基因数量。用 KEGG (<http://www.kegg.jp>) 和 GO (<http://wego.genomics.org.cn/>) 数据库 (Ogata *et al.*, 1999) 进行功能富集分析。使用 R 软件 Pheatmap 包 (<http://www.r-project.org/>; R Foundation for Statistical Computing, Wien, 澳大利亚) 绘制热图。本研究测得的转录组数据已上传美国国家生物技术信息中心 (NCBI) SRA 数据库, BioProject PRJNA374773。

**1.4 实时荧光定量 PCR 验证差异表达基因的表达**  
采用实时荧光定量 PCR 的方法检测 1.3 节筛

选的在携带与未携带松材线虫的松墨天牛间差异表达的基因在松墨天牛不同组织中的相对表达量。这些基因包括气管中表达上调的核酸内切酶 V (endonuclease V) 基因 (*ENV*)、细胞周期蛋白依赖性激酶 1 (cyclin-dependent kinase 1) 基因 (*CDK1*)、热激蛋白 70-C (heat shock protein 70-C) 基因 (*HSP70-C*)、热激蛋白 70 (heat shock protein 70) 基因 (*HSP70*)、双重氧化酶 (dual oxidase) 基因 (*DUO*)、多腺苷酸结合蛋白 (PABPN1 protein) 基因 (*PABPN1*)、胰岛素样生长因子结合蛋白复合物酸不稳定亚基 (insulin-like growth factor-binding protein complex acid labile subunit) 基因 (*IGFP*)、热激蛋白 75 (heat shock protein 75) 基因 (*HSP75*) 等。使用 Primer Premier 6 设计内参基因 Actin 引物序列和目的基因引物序列,以 1.2 节合成的 cDNA 为模板,引物信息详见表 1。所需引物由北京六合华大基因科技有限公司合成。PCR 反应体系: 2 × Talent qPCR Premix 10 μL, 上下游引物 (10 μmol/L) 各 0.8 μL, cDNA 2 μL, 超纯水补至 20 μL。反应在 ABI 7300Plus 荧光定量 PCR 仪上进行。反应程序: 95℃ 预变性 30 s; 95℃ 变性 5 s, 55℃ 退火 30 s, 72℃ 延伸 30 s, 40 次循环;接着进行溶解曲线分析。表达结果依据 Ct 值,采用  $2^{-\Delta\Delta Ct}$  法计算相对表达量。使用 SPSS19.0 软件对所得数据进行统计分析。

## 2 结果

### 2.1 RNA-Seq 数据质控与评估

未携带松材线虫的松墨天牛气管、表皮及脂肪体的 Illumina 测序共得到 60 734 045 条 raw reads, 去除不可用数据 509 836 条,最后得到 60 224 209

条 clean reads。携带松材线虫的松墨天牛气管、表皮及脂肪体的 Illumina 测序共得到 66 296 151 条 raw reads, 去除不可用数据 715 587 条,最后得到 65 580 564 条 clean reads (表 2)。上述结果说明可用 reads 在 99% 以上,本研究测得的转录组数据质量优,可用于进一步分析。

对转录本进行聚类 and 组装分析共得到 55 059 条 unigenes,最大长度 2 845 bp,最小长度为 300 bp,平均长度为 1 536 bp,中位数长度为 906 bp,N50 长度为 2 516 bp。超过 1 kb 的 unigenes 有 12 394 条,占 22.5%,超过 2 kb 的 unigenes 有 13 219 条,占 24.0%。这些数据说明组装效果理想。

表 1 引物信息  
Table 1 Primer information

| 引物<br>Primers | 引物序列 (5' - 3')<br>Primer sequences |
|---------------|------------------------------------|
| ENV-F         | CAGAGCAGAACAACATATTAGG             |
| ENV-R         | GAGTTATTCACAGACAGACT               |
| CDK1-F        | TGGCAATATGTCTCACGAA                |
| CDK1-R        | CGCCTTCATCTTCTTGTC                 |
| HSP 70-C-F    | CGTTCAAGGTGGAGTTATCT               |
| HSP70-C-R     | GGTTATCAGCGGCACTAG                 |
| HSP 70-F      | AGTGTTGACCTGAAGAGAT                |
| HSP70-R       | GCTGTGTGTAAGTGGATT                 |
| DUO-F         | ATGACACTGCCTTACAAGAT               |
| DUO-R         | ATCGTTATGCTGCTCAACT                |
| PABPN1-F      | TGTTCTGTTCTTCTCTGTT                |
| PABPN1-R      | GAGGATGTGGTGCTATTGA                |
| IGFP-F        | ACGAGGAATAATGTGGAAGG               |
| IGFP-R        | GAAC TGACGATAAGCAATAGC             |
| HSP75-F       | TCCTGCTCAGAGTACAATG                |
| HSP75-R       | CGTTCTCGGCAAGATTA                  |
| Actin-F       | TGGGTATGGAATCTTTCGGGT              |
| Actin-R       | GGCCCTGATTTCTTTTGCA                |

表 2 松墨天牛成虫各组织转录组数据评估

Table 2 Analysis of the transcriptome data of adult tissues of *Monochamus alternatus*

| 样品<br>Sample | 原始 reads 数<br>Number of<br>raw reads | 低质量数据数<br>Number of adaptors/<br>low-quality reads | 微生物 (病毒/细菌) 污染数据数<br>Number of reads of microbes<br>(viruses/bacteria) | 有效 reads 数<br>Number of<br>valid reads | 有效 reads 所占比例 (%)<br>Proportion of<br>valid reads |
|--------------|--------------------------------------|----------------------------------------------------|------------------------------------------------------------------------|----------------------------------------|---------------------------------------------------|
| Ep-CK        | 22 359 506                           | 190 048                                            | 8 965                                                                  | 22 160 493                             | 99.11                                             |
| Tr-CK        | 19 190 469                           | 171 267                                            | 7 938                                                                  | 19 011 264                             | 99.07                                             |
| Fb-CK        | 19 184 070                           | 123 780                                            | 7 838                                                                  | 19 052 452                             | 99.31                                             |
| Ep-Bx        | 24 541 598                           | 150 433                                            | 26 348                                                                 | 20 288 739                             | 99.11                                             |
| Tr-Bx        | 21 283 674                           | 146 093                                            | 225 260                                                                | 20 912 321                             | 98.26                                             |
| Fb-Bx        | 20 470 879                           | 155 792                                            | 11 661                                                                 | 24 379 504                             | 99.34                                             |

Ep-Bx: 携带松材线虫的松墨天牛成虫表皮 Epidermis of *M. alternatus* adults carrying *B. xylophilus*; EP-CK: 未携带松材线虫的松墨天牛成虫表皮 Epidermis of *M. alternatus* adults without carrying *B. xylophilus*; Tr-Bx: 携带松材线虫的松墨天牛成虫气管 Trachea of *M. alternatus* adults carrying *B. xylophilus*; Tr-CK: 未携带松材线虫的松墨天牛成虫气管 Trachea of *M. alternatus* adults without carrying *B. xylophilus*; Fb-Bx: 携带松材线虫的松墨天牛成虫脂肪体 Fat body of *M. alternatus* adults carrying *B. xylophilus*; Fb-CK: 未携带松材线虫的松墨天牛成虫脂肪体 Fat body of *M. alternatus* adults without carrying *B. xylophilus*. 图 5 - 6 和表 3 同 The same for Figs. 5 - 6 and Table 3.

2.2 携带和未携带松材线虫的松墨天牛成虫组织转录组中的差异表达基因

以未携带松材线虫的松墨天牛成虫各组织的转录组数据为对照,携带松材线虫天牛成虫的气管中有差异表达基因 7 089 个,其中上调基因 4 526 个,下调基因 2 563 个。表皮中有差异表达基因 3 923 个,其中上调基因 2 575 个,下调基因 1 348 个。脂肪体中有差异表达基因 5 485 个,其中上调基因 1 748 个,下调基因 3 737 个。气管与表皮中共有的差异表达基因 1 871 个;其中二者全部上调的基因 849 个,全部下调的基因 425 个;气管中上调而表皮中下调的基因 265 个,气管中下调而表皮中上调的基因 332 个。表皮和脂肪体中共有的差异表达基因 1 587 个;其中二者全部上调的基因 480 个,全部下调的基因 676 个;表皮中上调而脂肪体中下调的基因 214 个,表皮中下调而脂肪体中上调的基因 217 个。气管与脂肪体中共有的差异表达基因 1 683 个;其中二者全部上调的基因 374 个,全部下调的基因 545 个;气管中上调而脂肪体中下调的基因 481 个,气管中下调而脂肪体中上调的基因 283 个。气管、表皮与脂肪体中共有的差异表达基因 1 446 个;三者全部上调的基因为 488 个,全部下调的基因为 367 个;气管与表皮中上调而脂肪体中下调的基因为 103 个,气管与脂肪体中上调表达而表皮中下调表达的基因为 78 个;表皮与脂肪体中上调而气管中下调的基因为 89 个;气管中上调而表皮和脂肪体中下调的基因为 163 个,表皮中上调而气管与脂肪体中下调的基因为 58 个;脂肪体中上调而气管与表皮中下调的基因为 100 个(图 1)。以上结果说明,松墨天牛气管相对于表皮及脂肪体是主要响应松材线虫的组织。

2.3 差异表达基因的功能注释

利用 BLASTX 程序将 55 059 条 unigenes 序列与 NR(14 234 条 unigenes), GO(4 022 条 unigenes)和 KEGG(6 098 条 unigenes)数据库进行比对,成功注释到 24 354 条 unigenes,占 44.23%。

KEGG 数据库注释到 6 098 条基因,占 11.1%。属于气管与表皮中的共有 2 696 条基因;经过比对,相较于未携带松材线虫的松墨天牛,携带松材线虫的松墨天牛气管中上调表达基因与下调表达基因最多的均为复制和修复(replication and repair)相关的,分别为 114 和 152 条;表皮组织中上调表达基因最多的为折叠、分类和降解(folding, sorting and degradation)相关的,为 54 条,下调表达基因最多的

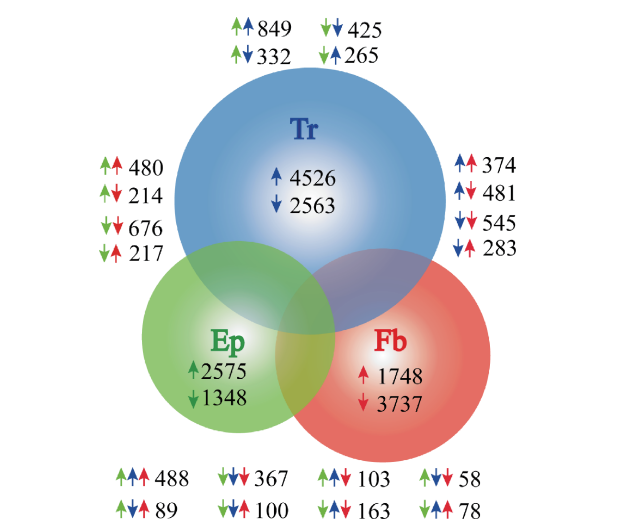


图 1 携带和未携带松材线虫的松墨天牛成虫转录组差异表达基因韦恩图

Fig. 1 Venn diagram of differentially expressed genes in *Monochamus alternatus* adults carrying and without carrying *Bursaphelenchus xylophilus*

Tr: 气管 Trachea; Ep: 表皮 Epidermis; Fb: 脂肪体 Fat body. 向上和向下的箭头分别表示上调和下调基因。Up and down arrows indicate up-regulated and down-regulated genes, respectively.

为信号分子与相互作用(signaling molecules and interaction)相关的,为 44 条(图 2)。

GO 数据库注释到 4 022 条基因,占 7.3%;相较于未携带松材线虫的松墨天牛,携带松材线虫的松墨天牛表皮与气管中上调的基因(图 3)中属于细胞组分(cellular component)分类的主要有细胞(cell)、细胞外区域组分(cell part)和细胞内区域组分(intracellular part)等;属于分子功能(molecular function)分类的主要为催化活性(catalytic activity)、水解酶活性(hydrolase activity)和转移酶活性(transferase activity)等;属于生物学过程(biological process)分类的有代谢过程(metabolic process)、含氮化合物代谢过程(nitrogen compound metabolic process)和有机物代谢过程(organic substance metabolic process)等。下调的基因(图 4)中属于细胞组分分类的主要有细胞(cell)、细胞外区域组分(cell part)和细胞内液(intracellular fluid)等;属于分子功能分类的主要为催化活性(catalytic activity)、结合(binding)和杂环基因的结合(heterocyclic compound binding)等;属于生物学过程分类的有代谢过程(metabolic process)、含氮化合物代谢过程(nitrogen compound metabolic process)和有机物代谢过程(organic substance metabolic process)等。

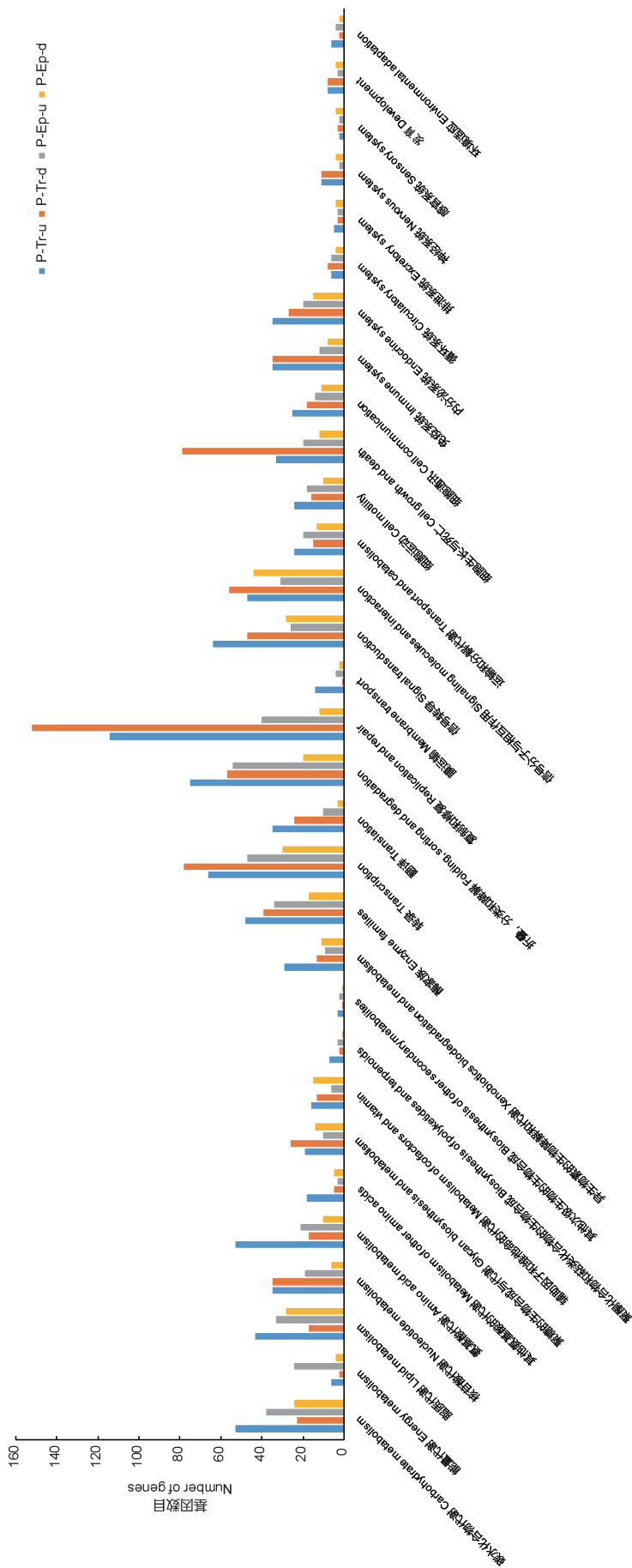


图 2 在携带与未携带松材线虫的松墨天牛成虫转录组间差异表达基因的 KEGG 注释分布

Fig. 2 KEGG annotation distribution of differentially expressed genes between *Monochamus alternatus* adults carrying and without carrying *Bursaphelenchus xylophilus*

P-Tr-u: 气管中上调基因 Up-regulated genes in trachea; P-Tr-d: 气管中下调基因 Down-regulated genes in trachea; P-Ep-u: 表皮中上调基因 Up-regulated genes in epidermis; P-Ep-d: 表皮中下调基因 Down-regulated genes in epidermis.

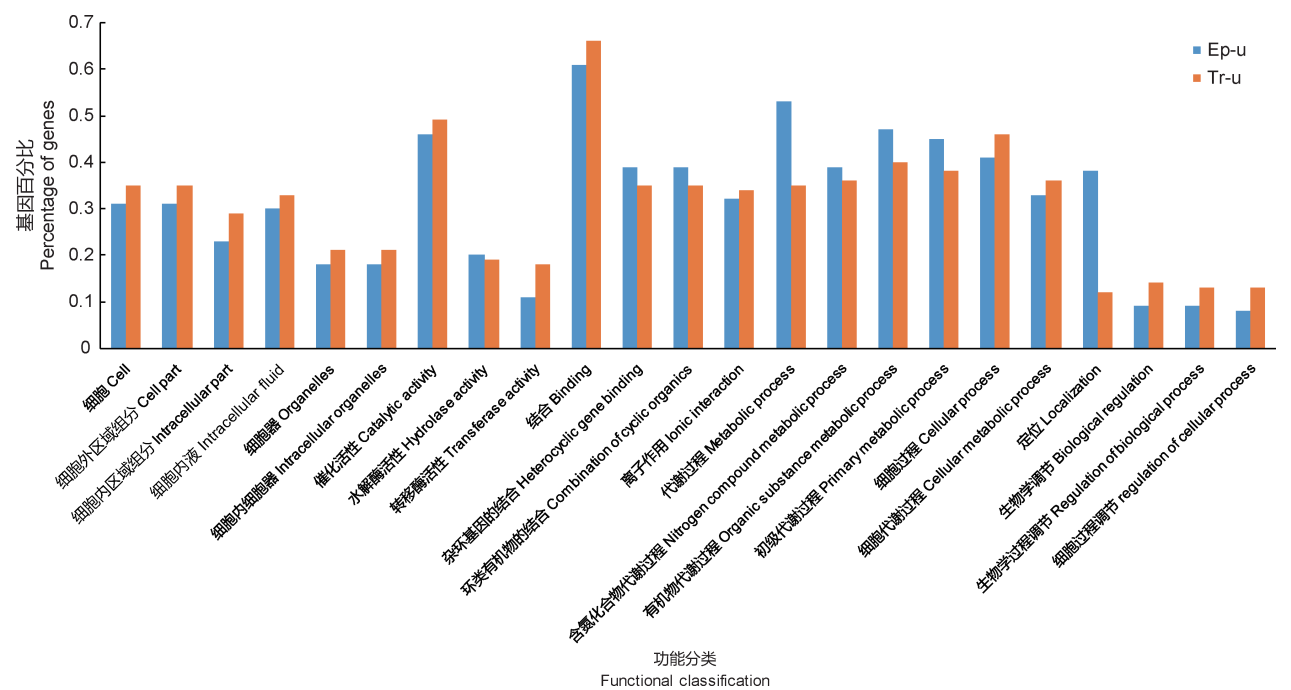


图3 在携带松材线虫松墨天牛成虫表皮与气管转录组中上调基因的 GO 注释分布

Fig. 3 GO annotation distribution of up-regulated genes in epidermis and trachea transcriptomes of *Monochamus alternatus* adults carrying *Bursaphelenchus xylophilus*

Tr-u: 气管中上调表达的基因 Up-regulated genes in trachea; Ep-u: 表皮中上调表达的基因 Up-regulated genes in epidermis.

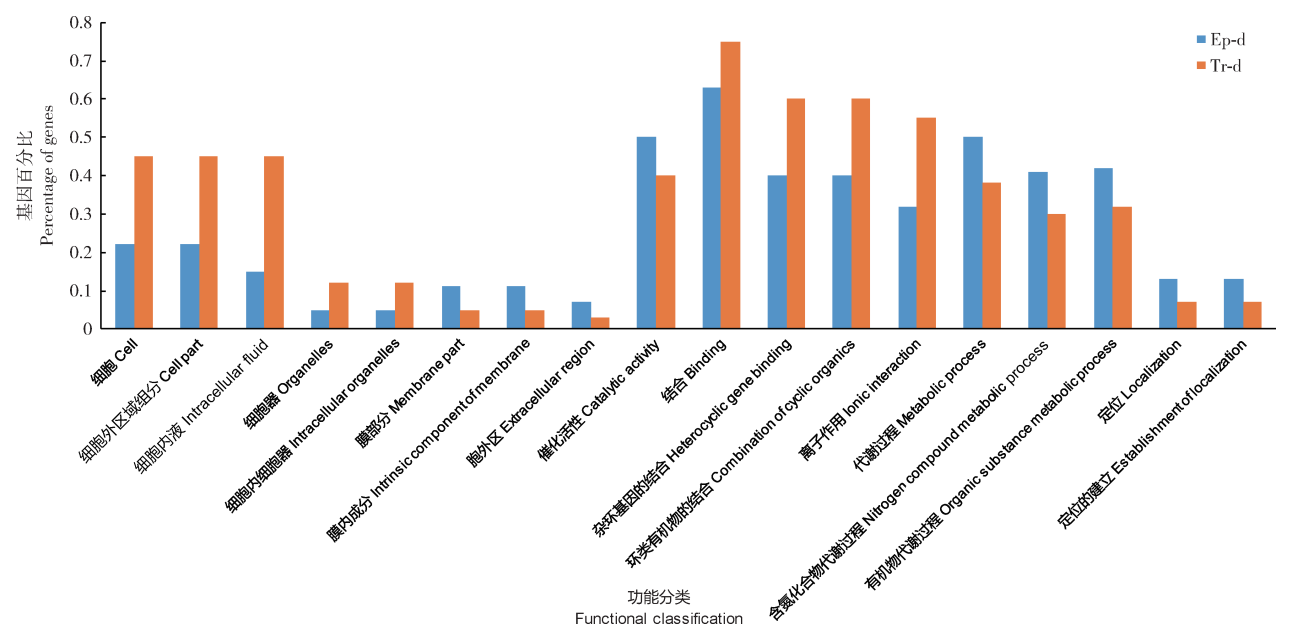


图4 在携带松材线虫松墨天牛成虫表皮与气管转录组中下调基因的 GO 注释分布

Fig. 4 GO annotation distribution of down-regulated genes in epidermis and trachea transcriptomes of *Monochamus alternatus* adults carrying *Bursaphelenchus xylophilus*

Tr-d: 气管中下调表达的基因 Down-regulated genes in trachea; Ep-d: 表皮中下调表达的基因 Down-regulated genes in epidermis.

其中,GO 功能富集分析结果表明,气管样品中上调的基因主要富集在分子功能中的催化活性、结合、生物学过程中的代谢过程和细胞过程(图3);下调的基因则主要富集在细胞组分中的细胞、细胞外区域组分、细胞内区域组分以及分子功能分类中的结合杂环基因的結合、环类有机物的結合和离子作用(图4)。表皮样品中上调的基因同样主要富集在分子功能中的催化活性、结合以及生物学过程中的代谢过程、有机物质代谢过程及初级代谢过程(图4);下调的基因则富集在分子功能中的催化活性、结合

以及生物过程中的代谢过程、含氮化合物代谢过程和有机物代谢过程(图4)。

2.4 松墨天牛胁迫响应相关基因的鉴定

通过 GO, KEGG 和 NR 注释分析显示,松墨天牛携带松材线虫后,复制和修复相关功能通路基因表达显著上调,热图分析进一步表明其在携带松材线虫的松墨天牛的表皮和气管中显著上调(图5)。其中,气管中上调表达的共济失调蛋白(ataxin-3-like)基因、锌指蛋白(zinc finger protein)基因、小核糖核蛋白颗粒蛋白 SmE(small ribonucleoprotein particle protein SmE)基因,IGFP 基因、ENV 基因、CDK1 基因、HSP70-C 基因、HSP70 基因、DUO 基因、中链酰基辅酶 A 脱氢酶(medium-chain specific acyl-CoA dehydrogenase, mitochondri)基因、锚蛋白重复和 FYVE 域蛋白(ankyrin repeat and FYVE domain-containing protein 1)基因、CREB 结合蛋白(CREB-binding protein)基因、参与囊泡运输的内质网(ER)蛋白(vesicle-associated membrane protein-associated protein B)基因,HSP75 基因,可能的 RNA 解旋酶(putative RNA helicase mov-10-B. 1)基因和半胱氨酸蛋白酶抑制剂(Cystatin-C)基因等,与胁迫响应相关(表3)。经过定量 PCR 验证,其中 CDK1 基因、HSP70 基因、HSP75 基因、DUO 基因、PABPN1 基因和 IGFP 基因的表达量在携带松材线虫的松墨天牛成

虫气管中相比未携带松材线虫的松墨天牛气管中的显著上调(图6)。

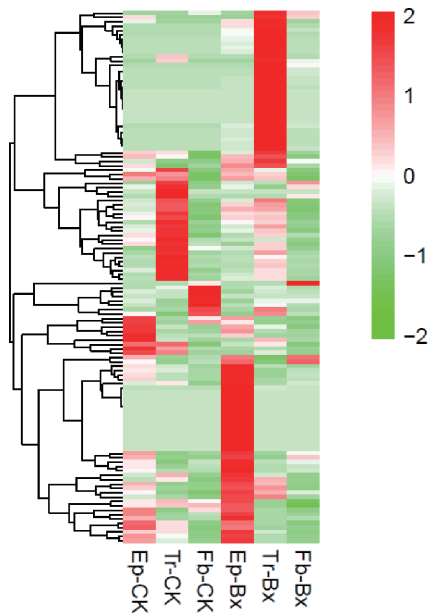


图5 胁迫响应相关基因在携带与未携带松材线虫的松墨天牛成虫组织中的表达热图

Fig. 5 Heat map showing expression of genes related to stress response in the adult tissues of *Monochamus alternatus* carrying and without carrying *Bursaphelenchus xylophilus*

| 表3 携带和未携带松材线虫的松墨天牛成虫各组织中显著上调的压力调节相关基因                                                                                                                                                    |                                                                                |                             |       |       |       |       |       |
|------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------|--------------------------------------------------------------------------------|-----------------------------|-------|-------|-------|-------|-------|
| Table 3 Significantly up-regulated genes related to pressure regulation in adult tissues of <i>Monochamus alternatus</i> carrying and without carrying <i>Bursaphelenchus xylophilus</i> |                                                                                |                             |       |       |       |       |       |
| 基因 ID<br>Gene ID                                                                                                                                                                         | NR 数据库注释信息<br>Nr database annotation information                               | 基因表达量 Gene expression level |       |       |       |       |       |
|                                                                                                                                                                                          |                                                                                | Ep-Bx                       | Tr-Bx | Fb-Bx | Ep-CK | Tr-CK | Fb-CK |
| comp66412_c0_seq13                                                                                                                                                                       | 双重氧化酶 DUOX<br>胰岛素样生长因子结合蛋白复合物酸不稳定亚基                                            | 0.43                        | 1.02  | 0.42  | 0.59  | 0.68  | 0     |
| comp71324_c0_seq1                                                                                                                                                                        | Insulin-like growth factor-binding protein complex acid labile subunit         | 1.95                        | 2.47  | 0.68  | 1.37  | 0.22  | 0.59  |
| comp1416939_c0_seq1                                                                                                                                                                      | 组蛋白赖氨酸 N-甲基转移酶<br>Histone-lysine N-methyltransferase                           | 0                           | 0.79  | 0.16  | 0     | 0     | 0     |
| comp56144_c0_seq4                                                                                                                                                                        | 核酸内切酶 V Endonuclease V<br>线粒体中链酰基辅酶 A 脱氢酶                                      | 0.11                        | 2.2   | 0.09  | 0     | 0     | 0     |
| comp459307_c0_seq1                                                                                                                                                                       | Medium-chain specific acyl-CoA dehydrogenase, mitochondrial                    | 0.21                        | 1.82  | 0     | 0     | 0     | 0     |
| comp38311_c0_seq1                                                                                                                                                                        | 无嘌呤无嘧啶 DNA 裂解酶<br>DNA-(apurinic or apyrimidinic site) lyase                    | 0.19                        | 1.26  | 0     | 0     | 0     | 0     |
| comp473734_c0_seq1                                                                                                                                                                       | DNA 连接酶 1 DNA ligase 1                                                         | 0.22                        | 1.81  | 0     | 0     | 0     | 0     |
| comp61820_c0_seq1                                                                                                                                                                        | 参与囊泡运输的内质网(ER)蛋白 B<br>Vesicle-associated membrane protein-associated protein B | 0.56                        | 8.54  | 0     | 0     | 0     | 0     |
| comp557178_c0_seq1                                                                                                                                                                       | 细胞周期蛋白依赖性激酶 1<br>Cyclin-dependent kinase 1                                     | 4.05                        | 4.57  | 1.97  | 3.8   | 0.93  | 1.34  |
| comp616611_c0_seq1                                                                                                                                                                       | 热激蛋白 75 kDa, 线粒体样<br>Heat shock protein 75 kDa, mitochondrial-like             | 0                           | 2.21  | 0     | 0     | 0     | 0     |

续表 3 Table 3 continued

| 基因 ID               | NR 数据库注释信息                                                            | 基因表达量 Gene expression level |       |       |       |       |       |
|---------------------|-----------------------------------------------------------------------|-----------------------------|-------|-------|-------|-------|-------|
| Gene ID             | Nr database annotation information                                    | Ep-Bx                       | Tr-Bx | Fb-Bx | Ep-CK | Tr-CK | Fb-CK |
|                     | 一般转录和 DNA 修复因子 IIIH 解旋酶亚基 XPD                                         |                             |       |       |       |       |       |
| comp2097377_c0_seq1 | General transcription and DNA repair factor IIIH helicase subunit XPD | 1.48                        | 3.43  | 0.12  | 2.89  | 0.76  | 0.38  |
| comp677104_c0_seq1  | 蛋白质 IMPACT 同源物 Protein IMPACT homolog                                 | 0.34                        | 2.64  | 0     | 0     | 0     | 0     |
| comp57202_c0_seq1   | 可能的 RNA 解旋酶 Putative RNA helicase mov-10-B. 1                         | 0.12                        | 4.08  | 0.16  | 0     | 0     | 0     |
| comp58077_c0_seq1   | 半胱氨酸蛋白酶抑制剂 Cystatin-C                                                 | 0.21                        | 6.49  | 0.25  | 0     | 0     | 0     |
| comp395508_c0_seq1  | 瓣状内切核酸酶 1 Flap endonuclease 1                                         | 0.06                        | 1.32  | 0     | 0     | 0     | 0     |
| comp63149_c0_seq1   | 热激蛋白 40 Heat shock protein 40                                         | 1.1                         | 15.54 | 0.28  | 0     | 0     | 0     |
| comp45847_c0_seq1   | 多腺苷酸结合蛋白 PABPN1 protein                                               | 0.56                        | 8.54  | 0     | 0     | 0     | 0     |
| comp134747_c0_seq1  | 小核糖核蛋白颗粒蛋白 SmE                                                        | 0.59                        | 6.72  | 0.16  | 0     | 0     | 0     |
|                     | Small ribonucleoprotein particle protein SmE                          |                             |       |       |       |       |       |

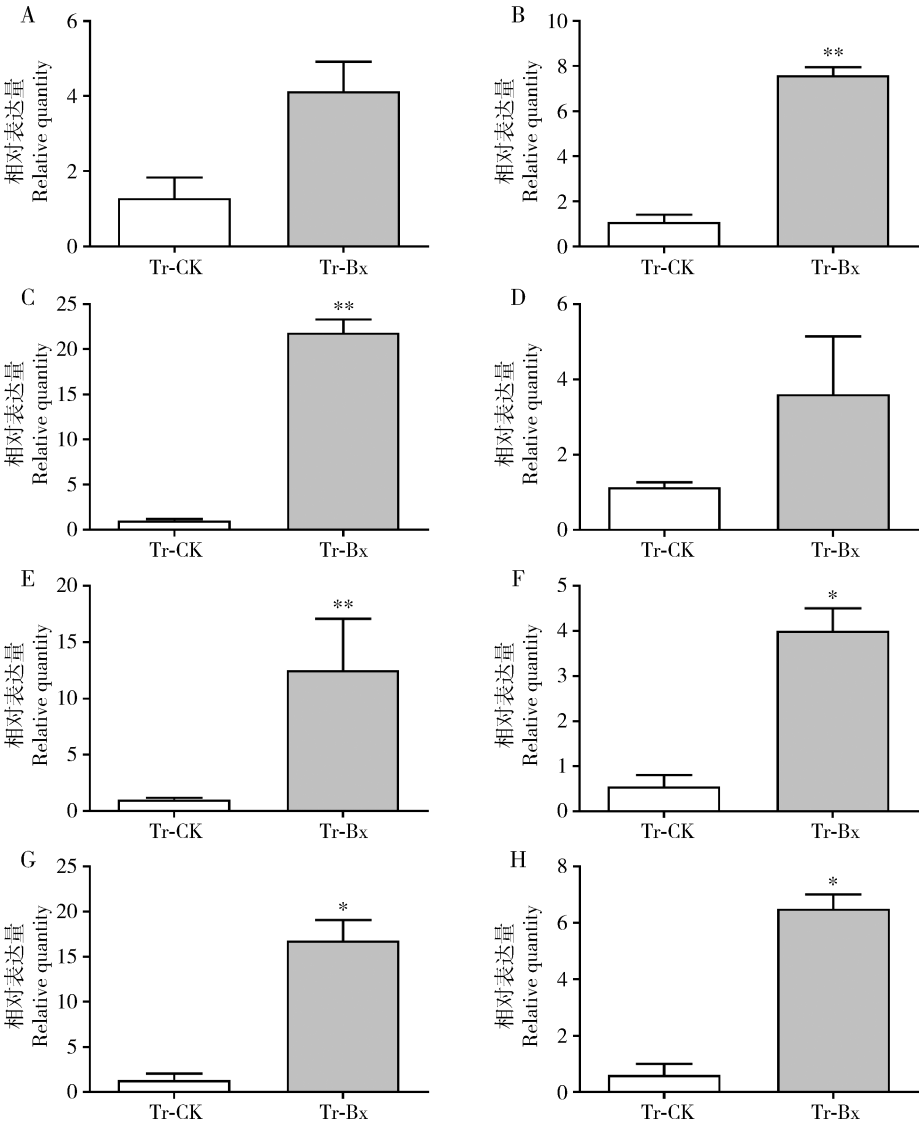


图 6 胁迫响应相关基因在携带与未携带松材线虫的松墨天牛成虫气管中表达的实时荧光定量 PCR 验证

Fig. 6 Expression verification of stress response-related genes in trachea of *Monochamus alternatus* adults carrying and without carrying *Bursaphelenchus xylophilus* by real-time quantitative PCR

A: *ENV*; B: *CDK1*; C: *HSP70-C*; D: *HSP70*; E: *DUO*; F: *PABPN1*; G: *IGFP*; H: *HSP75*. 基因表达量以 Tr-CK (对照) 中的为基准, 柱上星号 and 双星号分别表示两组间差异显著 ( $P < 0.05$ ) 和极显著 ( $P < 0.01$ ) (独立样本  $t$  检验)。The gene expression level in Tr-CK (control) was normalized to 1. The asterisk and double asterisk above bars indicate significant difference ( $P < 0.05$ ) and extremely significant difference ( $P < 0.01$ ), respectively, between two groups (independent samples  $t$ -test).

3 讨论

目前,在全球范围内植物病原体已经带来了许多毁灭性的病害,而昆虫媒介负责传播一些世界上最致命的病原体,且某些病原需要特定的昆虫才能传播(Suzuki *et al.*, 2006)。媒介昆虫对植物病原体的携带主要集中在果蝇或半翅目昆虫的肠道和唾液腺中(Basset *et al.*, 2000)。昆虫对线虫的携带研究主要在昆虫对寄生性线虫和昆虫病原线虫之间展开(Castillo *et al.*, 2011)。然而,媒介昆虫对植物病原线虫的携带,尤其是在气管系统中则鲜有报道。媒介昆虫松墨天牛能安全地携带成千上万头植物病原线虫——松材线虫而不影响其寿命,所以研究松墨天牛与松材线虫间的共生互作关系十分必要。本研究利用 Illumina 测序技术对携带与未携带松材线虫的松墨天牛进行转录组测序和分析,在无参考基因组转录组测序情况下,共获得 55 059 条 unigenes。其中 4 022 条 unigene 在 GO 数据库中获得注释,6 098 条 unigene 在 KEGG 数据库中获得注释。通过分析后发现松墨天牛携带松材线虫后,差异基因主要为松墨天牛气管中压力调节、组织与 DNA 修复相关通路,为进一步发掘重要的功能基因奠定基础。

通过对比携带及未携带松材线虫的松墨天牛的气管、表皮及脂肪体的转录组数据,发现除脂肪体外,携带松材线虫的松墨天牛气管与表皮组织中的差异表达基因均以上调为主,其中尤以气管中的基因表达量变化最大,高于其余两组织中的差异表达基因总数及上调基因数。对差异表达基因的 GO 和 KEGG 分析结果显示,携带松材线虫的松墨天牛气管及表皮中富集到的功能通路相一致,且表达模式也相一致。说明尽管松材线虫在天牛气管中被携带,昆虫气管系统是由外胚层细胞内陷形成,其内壁与表皮相连,与表皮构造相同,昆虫表皮及气管系统都具有一层上皮细胞且相连,作为昆虫的第一道防线抵挡外来物侵染。前期研究显示,松墨天牛对松材线虫的响应过程中,总体上松墨天牛的免疫处于压制状态,表皮和气管中一部分免疫基因上调表达,大部分免疫基因表达水平不变,松墨天牛通过活性氧调节维持二者间免疫稳态(Zhou *et al.*, 2017, 2018)。在本研究中,我们通过进一步转录组分析,筛选到大量胁迫响应基因在携带松材线虫的松墨天牛中上调,说明松材线虫对于松墨天牛更像是一种压力因子的存在,而不是一种外来侵染物,可能是二者长期

协同进化的过程中建立的特殊共生关系的体现。

根据 KEGG 分析及 GO 分析可看出,当松材线虫进入天牛气管后,表达量上调的共济失调蛋白、酪氨酸激酶受体等与 DNA 修复和细胞损伤修复有关,其中尤以 PABPN1 蛋白表达量变化最为明显。而 CREB 结合蛋白、锌指蛋白、PABPN1 蛋白、RNA 结合蛋白与真核基因表达调控以及 RNA 合成与代谢有关等方面的基因表达量增加;同时作为生殖系干细胞调节基因的核小核糖核蛋白颗粒 SmE 则与生殖活动相关(Ishigak *et al.*, 2015; Dyson and Wright, 2016; Banerjee *et al.*, 2017),而催化活性过程中的上调的 FYVE 域蛋白则与激素相应和应对胁迫压力方面有潜在作用(Wang *et al.*, 2000; Yao *et al.*, 2016)。同时不难看出许多上调的基因均与 DNA 复制、损伤修复相关,如 Endonuclease V 与 DNA 的损伤修复相关;Cystatin-C 基因的表达产物被认为对半胱氨酸蛋白酶的局部调节有着十分重要的作用;Putative helicase mov-10-B.1 作为一种可能的 RNA 解旋酶,是 miRNA 介导的基因沉默过程所必需的;而 Heat shock protein 75 kD, mitochondrial(precursor)表达形成的 TNFR 及其下游激酶则直接与细胞增殖调节与胁迫响应有关(Copeland, 2012)。所以我们推测,作为松材线虫的传播媒介,松墨天牛在携带松材线虫后,通过增强遗传物质与细胞组织修复及真核基因转录调控等方面的基因表达,来提高自身对于松材线虫的耐受性,抵消松材线虫寄生所带来的不利影响,重新维持了自身正常生命稳态,从而为松材线虫与松墨天牛之间形成共生关系提供了可能。

本研究从转录组测序方面探究了携带与不携带松材线虫状态下的松墨天牛气管、表皮及脂肪体 3 个组织间表达基因的变化,为探究二者之间的共生关系提供了基础数据支持,为松材线虫防治工作提供了新的参考思路。后续我们将对重点差异表达基因的功能进行分析,更全面深入地解析松墨天牛在携带松材线虫后所发生的生理变化的分子机制,为将来的实际应用打下良好基础。

参考文献 (References)

Banerjee A, Vest KE, Pavlath GK, Corbett AH, 2017. Nuclear poly (A) binding protein 1 (PABPN1) and Matrin3 interact in muscle cells and regulate RNA processing. *Nucleic Acids Res.*, 45 (18): 10706 – 10725.

Basset A, Khush RS, Braun A, Gardan L, Boccard F, Hoffmann JA, Lemaitre B, 2000. The phytopathogenic bacteria *Erwinia carotovora* infects *Drosophila* and activates an immune response. *Proc. Natl.*

- Acad. Sci. USA*, 97(7): 3376–3381.
- Castillo JC, Reynolds SE, Eleftherianos I, 2011. Insect immune responses to nematode parasites. *Trends Parasitol.*, 27(12): 537–547.
- Copeland WC, 2012. Defects in mitochondrial DNA replication and human disease. *Crit. Rev. Biochem. Mol. Biol.*, 47(1): 64–74.
- Dyson HJ, Wright PE, 2016. Role of intrinsic protein disorder in the function and interactions of the transcriptional coactivators CREB-binding protein (CBP) and p300. *J. Biol. Chem.*, 291(13): 6714–6722.
- Futai K, 2008. Pine wilt in Japan: from first incidence to the present. In: Zhao BG, Futai K, Sutherland JR, Takeuchi Y eds. *Pine Wilt Disease*. Springer, Tokyo. 5–12.
- Grabherr MG, Haas BJ, Yassour M, Levin JZ, Thompson DA, Amit I, Adiconis X, Fan L, Raychowdhury R, Zeng Q, Chen Z, Mauceli E, Hacohen N, Gnirke A, Rhind N, di Palma F, Birren BW, Nusbaum C, Lindblad-Toh K, Friedman N, Regev A, 2011. Full-length transcriptome assembly from RNA-Seq data without a reference genome. *Nat. Biotechnol.*, 29(7): 644–652.
- Ishigaki Y, Nakamura Y, Tatsuno T, Ma S, Tomosugi N, 2015. Phosphorylation status of human RNA-binding protein 8A in cells and its inhibitory regulation by Magoh. *Exp. Biol. Med.*, 240(4): 438–445.
- Karnkowski W, Sahajdak A, 2010. Occurrence of the pinewood nematode in Portugal and Spain-threat for pine forests in Europe. *Prog. Plant Prot.*, 50(3): 1260–1264.
- Li H, Durbin R, 2009. Fast and accurate short read alignment with Burrows-Wheeler transform. *Bioinformatics*, 25(14): 1754–1760.
- Li W, Godzik A, 2006. Cd-hit: a fast program for clustering and comparing large sets of protein or nucleotide sequence. *Bioinformatics*, 22(13): 1658–1659.
- Mamiya Y, 1972. Pine wood nematode, *Bursaphelenchus lignicolus* Mamiya and Kiyohara, as a casual agent of pine wilting disease. *Rev. Plant Prot. Res.*, 5: 46–60.
- Mamiya Y, 1983. Pathology of the pine wilt disease caused by *Bursaphelenchus xylophilus*. *Annu. Rev. Phytopathol.*, 21: 201–220.
- Nakamura-Matori K, 2008. Vector-host tree relationships and the abiotic environment. In: Zhao BG, Futai K, Sutherland JR, Takeuchi Y eds. *Pine Wilt Disease*. Springer, Tokyo. 144–161.
- Nickle WR, Golden AM, Mamiya Y, Wergin WP, 1981. On the taxonomy and morphology of the pine wood nematode, *Bursaphelenchus xylophilus* (Steiner & Buhner 1934) Nickle 1970. *J. Nematol.*, 13(3): 385.
- Ning T, Fang YL, Tang J, Sun JH, 2005. Status of monitoring and control of pine wood nematode and its media, *Monochamus alternatus*. *Chin. Bull. Entomol.*, 42(3): 264–269. [宁眺, 方宇凌, 汤坚, 孙江华, 2005. 松材线虫及其传媒松墨天牛的监测和防治现状. 昆虫知识, 42(3): 264–269]
- Ogata H, Goto S, Sato K, Fujibuchi W, Bono H, Kanehisa M, 1999. KEGG: Kyoto Encyclopedia of Genes and Genomes. *Nucleic Acids Res.*, 27(1): 29–34.
- Shin SC, 2008. Pine wilt disease in Korea. In: Zhao BG, Futai K, Sutherland JR, Takeuchi Y eds. *Pine Wilt Disease*. Springer, Tokyo. 26–32.
- Sun YC, 1982. *Bursaphelenchus xylophilus* was discovered in Sun Yet-sen's Mausoleum in Nanjing. *J. Jiangsu For. Sci. Tech.*, (4): 47, 27. [孙永春, 1982. 南京中山陵发现松材线虫. 江苏林业科技, (4): 47, 27]
- Suzuki S, Oshima K, Kakizawa S, Arashida R, Jung HY, Yamaji Y, Nishigawa H, Ugaki M, Namba S, 2006. Interaction between the membrane protein of a pathogen and insect microfilament complex determines insect-vector specificity. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, 103(11): 4252–4257.
- Wang GH, Sawai N, Kotliarova S, Kanazawa I, Nukina N, 2000. Ataxin-3, the MJD1 gene product, interacts with the two human homologs of yeast DNA repair protein RAD23, HHR23A and HHR23B. *Hum. Mol. Genet.*, 9(12): 1795–1803.
- Wei YN, 2015. Ascarosides-mediated Interaction Control between Pine Wood Nematode and *Monochamus alternatus*. MSc Thesis, Northeast Forestry University, Harbin. [魏亚楠, 2015. Ascarosides 介导的松材线虫与松墨天牛种间互作调控研究. 哈尔滨: 东北林业大学硕士学位论文]
- Xie BY, Cheng XY, Shi J, Zhang QW, Dai SM, Cheng FX, Luo YQ, 2009. The formation and expansion mechanism of pine wood nematode invasive populations – the progress of the national key basic research development plan “basic research on the invasion mechanism and control of agricultural and forestry dangerous organisms”. *Sci. China Ser. C Life Sci.*, 39(4): 333–341. [谢丙炎, 成新跃, 石娟, 张青文, 戴素明, 成飞雪, 骆有庆, 2009. 松材线虫入侵种群形成与扩张机制——国家重点基础研究发展计划“农林危险生物入侵机理与控制基础研究”进展. 中国科学 C 辑: 生命科学, 39(4): 333–341]
- Yano S, 1913. Investigation on pine death in Nagasaki prefecture. *Sanrin-Kouhou*, 4: 1–14.
- Yao L, 2016. Genome-wide Identification of Grainy Head Target Genes and Their Functions in *Drosophila* Embryos. PhD Dissertation, Stockholm University, Stockholm.
- Zhang XY, Luo YQ, 2003. Major Biological Disasters in China's Forests. China Forestry Publishing House, Beijing. [张星耀, 骆有庆, 2003. 中国森林重大生物灾害. 北京: 中国林业出版社]
- Zhao L, Zhang S, Wei W, Hao H, Zhang B, Butcher RA, Sun J, 2013. Chemical signals synchronize the life cycles of a plant-parasitic nematode and its vector beetle. *Curr. Biol.*, 23(20): 2038–2043.
- Zhao L, Zhang X, Wei Y, Zhou J, Zhang W, Qin P, Chinta S, Kong X, Liu Y, Yu H, Hu S, Zou Z, Butcher RA, Sun J, 2016. Ascarosides coordinate the dispersal of a plant-parasitic nematode with the metamorphosis of its vector beetle. *Nat. Commun.*, 7: 12341.
- Zhou J, Yu HY, Zhang W, Ahmad F, Hu SN, Zhao LL, Zou Z, Sun JH, 2017. Comparative analysis of the *Monochamus alternatus* immune system. *Insect Sci.*, 25(4): 581–603.
- Zhou J, Zhao LL, Yu HY, Wang YH, Zhang W, Hu SN, Zou Z, Sun JH, 2018. Immune tolerance of vector beetle to its partner plant parasitic nematode modulated by its insect parasitic nematode. *FASEB J.*, 32(9): 4862–4877.